結核研究からハンセン病研究へ：分子生物学的見地から

鈴木定彦^{*1)}、山口智之¹⁾、金玄²⁾、横山和正³⁾、中島千絵¹⁾

¹⁾ 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・バイオリソース部門

²⁾ 国立感染症研究所細菌第2部

³⁾ キッセイ薬品工業（株）・創薬研究部バイオリジクス研究所

〔受付・掲載決定：2014年12月2日〕

キーワード：らい菌、薬剤耐性、ダブソン、リファンピシン、キノロン

ハンセン病の起因病原体であるらい菌は1873年に発見されて以来、数多くの研究が為されて来たが、人工培地上での培養の困難さ故に数々の困難をも経験して来た。ハンセン病の研究は、その困難を解消するために同じ *Mycobacterium* 属菌によって引き起こされる結核の研究により得られた知識を取り入れながら進歩してきたものといえる。らい菌の薬剤耐性獲得機序の分子生物学的研究を例にとると、リファンピシン耐性ならびにキノロン耐性には、それぞれ RNA 合成酵素 β サブユニットをコードする遺伝子ならびに DNA ジャイレースの A サブユニットをコードする遺伝子上の変異が重要である事が明らかとなっているが、これらは、結核研究で得られた情報を基にしてハンセン病研究が進められた結果である。今後もハンセン病研究は、結核研究の最新のトピックから多くの事を学び重要な情報を得てゆく必要があるものと考えられる。

はじめに

ハンセン病の起因病原体であるらい菌はノルウェーの医師ゲルハール・ヘンリック・アルマウエル・ハンセンにより1873年に発見された。その後、数多くのハンセン病研究者が膨大な時間と労力を費やしその培養を試みたが、未だこの菌の人工培地での増殖が成功したという信頼できる報告例はない。培養組織細胞を用いての増殖も試みられているが、こちらも大きな成果をあげたとは言い難い。幸いにも九帯アルマジロ *Dasypus novemcinctus* がらい菌に対して感受性を有することが発見され¹⁾、更にヌードマウス *Mus musculus* Balb/c nu/nu でらい菌の増殖が成功し^{2,3)}、一定量のらい菌菌体

の確保は可能となった。この菌体を利用して、らい菌の分子生物学的研究が開始されたが、人工培地での培養が可能な結核菌等の他の細菌に比べて少量しか確保されない菌体を用いた研究の進捗は同じ *Mycobacterium* 属菌である結核菌の研究により得られた知識を取り入れながら進歩してきたものといえる。本総説では、特にらい菌の薬剤耐性獲得機序の分子生物学的研究の見地からの例を挙げて、結核研究からハンセン病研究が学んで来た事、これから学ぶことについて紹介する。

結核菌およびらい菌の薬剤耐性

結核に対する化学療法の歴史は、1940年代に始まっている。最初の抗結核薬であるストレプトマイシン (STR) は1943年に単離され、1952年のセルマン・ワクスマンによるノーベル賞の対象となった。その後相次いで結核菌に効力を有する薬剤が発見されている。すなわち、現在最も重要な抗結核剤とされている2剤、イソニアジド (INH) とリファンピシン (RIF) が発見さ

*Corresponding author:

北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・バイオリソース部門

〒001-0020 札幌市北区北20条西10丁目

Tel: 011-706-9503 Fax: 011-706-7310

E-mail: suzuki@czc.hokudai.ac.jp

れたのはそれぞれ 1945 年ならびに 1968 年である。これに対して、耐性菌の出現までにはそれほどの時間を要することはなかった。すなわち、STR が広範に使われ始めて 1 年にも満たない 1948 年には既に STR 耐性菌の出現が報告されているのである。他の抗結核剤についても状況は同様であった。ハンセン病の化学療法の歴史は、1943 年にアメリカにおいて静脈注射薬用スルフォン剤プロミンの有効性が証明されたことから始まった。1950 年代前半には経口投与が可能なダブソン（DDS）が導入され、1970 年代後半までの 20 年以上に渡って DDS 単剤療法が実施された。しかしながら、1970 年代に入ってから浮上した DDS 耐性菌の問題を解決するために世界保健機構（WHO）は DDS に RIF およびクロファジミン（CFZ）を加えた多剤併用療法を世界に普及させた。

結核において薬剤耐性菌が出現した当初は、原因菌の増殖速度は非常に遅く、さらに病原性および伝播性も低いと考えられていた。しかしながら、米国において後天性免疫不全症候群患者間で病原性を持って伝播する多剤耐性結核菌が発見されて以来、この考え方をさえざるを得なくなった。これに加えて、南アフリカ KwaZulu-Natal 県の病院において流行した超多剤耐性結核の事例が、「多剤耐性結核＝低伝播性」という考え方を払拭した。即ち、この事例では超多剤耐性結核を発症した 53 人の患者のうちの 52 人が死亡したが、85% の患者からは同一または類似した遺伝子型を持つ結核菌株が分離された⁴⁾。今日の結核全体の治癒率は 80% 以上にまで向上しているが、多剤耐性結核および超多剤耐性結核では治癒率がそれぞれ約 50% および 30% に低下することが報告されている。したがって、超多剤耐性結核が蔓延した場合には結核が不治の病と呼ばれていた時代へと逆戻りすることになる。ハンセン病においても現状ですでに DDS または RIF に対して耐性のハンセン病や両剤に耐性の多剤耐性ハンセン病が出現して来ており、その広がりや危惧されている^{5,6)}。

薬剤耐性獲得機構の解析

多剤耐性結核ならびに多剤耐性ハンセン病の蔓延を食い止めるためには、薬剤感受性を早期に判定して、適切な処方による治療を施す必要がある。そのため、迅速かつ簡便な遺伝子診断法導入が鍵となることから、結核菌およびらい菌の薬剤耐性獲得機構の解明のための多くの研究が為されてきた。その結果、薬剤の標的分子上に出現する突然変異が唯一の薬剤耐性獲得機構である事が明らかとなった。即ち、INH 耐性結核菌においては、カタラーゼ／ペルオキシダーゼ（KatG）をコードする遺伝子⁷⁾

またはエノイルリダクターゼ（InhA）をコードする遺伝子⁸⁾ 上の変異、RIF 耐性結核菌では RNA 合成酵素 β サブユニット（RpoB）をコードする遺伝子上の変異⁹⁾、キノロン耐性結核菌では DNA ジャイレースの A または B サブユニット（それぞれ GyrA および B）をコードする遺伝子上の変異¹⁰⁻¹²⁾ が耐性に係っている事が明らかとなった。らい菌においては、結核菌で得られた情報を基にして解析が進められ、RIF 耐性菌¹³⁻¹⁵⁾ ならびにキノロン耐性菌^{14,15)} において結核菌と同様な変異が報告された。一方、DDS はハンセン病に対してのみ用いられる化学療法剤であるため、らい菌においてのみ研究が進捗し、ジヒドロプロテロイン酸合成酵素（FolP1）をコードする遺伝子の変異が耐性に係っている事が明らかとなった^{16,17)}。

Fitness cost を補完する遺伝子変異と 多剤耐性菌出現機序

一方、最近になって結核菌においては薬剤耐性を付与する遺伝子変異により発生した菌自体の生存ならびに増殖に係る対価（以下 Fitness cost と呼ぶ）を補完する形での新たな遺伝子変異を介した菌の適合進化が薬剤耐性獲得過程で重要であることも報告されている¹⁸⁾。薬剤耐性を獲得するための遺伝子変異は多様であるが、fitness cost の増大を伴う薬剤耐性関連遺伝子変異が導入された菌株（図 1 A）は容易に優勢となる事は無く、補完的変異が導入され fitness cost が減少した場合（図 1 B）のみ優勢となる。一方、fitness cost の増大を伴わない薬剤耐性関連遺伝子変異が導入された菌株（図 1 C）は当該薬剤治療により容易に優勢となる。この考え方を基にして多剤耐性獲得機序を考えてみる。結核治療の歴史から考えて結核菌が多剤耐性を獲得する場合（図 2 A）には、最初に INH 耐性となったものと考えられている。結核菌が INH 耐性になるためには KatG の 315 番目のアミノ酸のセリンがスレオニンに置換される遺伝子変異（KatG 315T）を獲得する場合とそれ以外の大きく 2 つに分類される。KatG 315T を有する菌株（図 2 (a)）においては、fitness cost の増大が見られないことから、補完的変異なしでも正常に増殖できる。一方、KatG 315T 以外の INH 耐性関連遺伝子変異が導入された場合（図 2 (b)）には fitness cost の増大が見られ、アルキルパーオキシドレダクターゼ（AphC）をコードする遺伝子に補完的変異が導入された菌株（図 2 (c)：+AphC）のみが正常に増殖する。INH 耐性菌が RIF 耐性形質を獲得して多剤耐性と呼ばれるためには正常な増殖能を持つ必要がある。結核菌が RIF 耐性になるためには RpoB の 531

図1 薬剤耐性獲得に係る Fitness cost の増大と補完変異による適合進化

(A) Fitness cost の増大を伴う耐性化、(B) 補完変異が導入された事による Fitness cost の減少、(C) Fitness cost の増大を伴わない耐性化

図2 結核菌とらい菌の多剤耐性獲得機構

A. 結核菌の多剤耐性獲得機構、B. らい菌の多剤耐性獲得機構

番目のアミノ酸セリンがロイシンに置換される遺伝子変異 (RpoB 531L; 図2 A (c)) を持つ場合とそれ以外の大きく2つに分類される。RpoB 531Lを持つ菌株においては、fitness cost の増大が見られないことから、補完的変異なしでも正常に増殖する。一方、RpoB 531L以外のRIF耐性関連遺伝子変異が導入された場合 (図2 e) には fitness cost の増大が見られ、RNA合成酵素 α サブユニット (RpoA) または β' サブユニット (RpoC) をコードする遺伝子上に特定の補完的変異が導入された菌株 (図2 f: +RpoA/RpoC) のみが正常に増殖する。結果としてKatG 315TとRpoB 531Lを有する多剤耐性結核菌が大勢を占めることとなるのである。

結核研究から推測された多剤耐性菌出現のメカニズムをらい菌に当てはめて考えてみる事にする。これまでにDDS、RIFならびにオフロキサシン (OFX) 耐性に係るいくつかの遺伝子変異が報告されている¹³⁻¹⁷⁾。DDS耐性菌においてはFolP1をコードする遺伝子の53番目と55番目にアミノ酸置換を伴う遺伝子変異が見出されている。特に55番目のプロリンがロイシンに置換される変異 (FolP1 55L) が検出される率が高い。一方、RIF耐性菌においては、結核菌のRpoB 531Lに当たるRpoB 425Lが大半を占めているが、これ以外も幾種類かの遺伝子変異が見出されている。これらの事実とハンセン病治療の歴史から多剤耐性らい菌の出現機序が想像できる

図3 らい菌および結核菌の gyrA 上に見出されたキノロン耐性を付与する塩基置換

A. らい菌、B. 結核菌。数字はアミノ酸番号。3つの連続した大文字はコドン。大文字とそれに続く2つの小文字でアミノ酸を示す。太線の四角で囲んだものはそれぞれの菌種において最も頻繁に見出される変異コドンとそれに伴うアミノ酸置換

(図2B)。らい菌は、最初に主として FolP1 55L 遺伝子変異により DDS 耐性となるものと考えられる(図2(d))。FolP1 55L を持ったらい菌では、fitness cost の増大が見られないが、これ以外の DDS 耐性関連遺伝子変異が導入された場合には fitness cost が増大するため、補完的変異が導入された菌株(図2(e):+X)のみが正常に増殖する事が予想される。この X は補完的変異と考えられるが、現在のところ不明である。全ゲノム配列の比較等の網羅的解析が必要なものと考えられる。DDS 耐性菌が RIF 耐性形質を獲得して多剤耐性と呼ばれるためには正常な増殖能を持つ必要がある。RIF 耐性に係る遺伝子変異は RpoB 425L とそれ以外の大きく2つに分類される。RpoB 425L を有する RIF 耐性らい菌が数多く見出されていることから、本菌においては、fitness cost の増大が見られず、補完的変異なしでも正常に増殖するものと考えられる。一方、RpoB 425L 以外の RIF 耐性関連遺伝子変異が導入された場合(図2e)には fitness cost の増大が見られ、特定の補完的変異が導入された菌株(図2f:X、DDS 耐性と同様に補完的変異は未同定)のみが正常に増殖する。結核菌で得られている情報を基にして RpoA または RpoC を解析する事により何らかの結論が得られる可能性がある。

以上の様な機序により FolP1 55L と RpoB 425L を有している多剤耐性らい菌が大勢を占めることとなったと考えられる。

キノロン耐性獲得機序と fitness cost

らい菌にキノロン耐性を付与するとして報告のあるアミノ酸置換は GyrA の 89 番目のシステインをグリシンに置換(GyrA 89G)する遺伝子変異と 91 番目のアラニンバリリンに置換(GyrA 91V)する遺伝子変異の僅か2種類にすぎず、これらのうち GyrA 91V が大半を占めている^{13,14)}。一方、結核菌においては、非常に多くの臨床分離株から得られたデータにより、多種、多様なキノロン耐性関連遺伝子変異が明らかにされている¹⁹⁾(図3B)。中でも多いのは、らい菌の 95 番目に当たる 94 番目のアスパラギン酸がグリシンに置換(GyrA 94G)される遺伝子変異である。興味深いのは、この変異がらい菌では報告がない事である。もちろん、らい菌において報告されているキノロン耐性株の総数は結核菌のそれに比べて大幅に少ないが、それだけではこの現象は説明できない。筆者らは、野性型に加えて、89C、91V、95N ならびに 95G の変異型 DNA ジャイレース A サブユニットを組換え蛋白質として発現・精製し、これらを同様に発現・精製した B サブユニットと混合する事により活性型 DNA ジャイレースを構築し、それぞれの DNA ジャイレースの活性を各種キノロン存在下に評価した。その結果、全ての変異型 A サブユニットを有する DNA ジャイレースでは野性型と比べてキノロンに

図4 野生型および変異型 DNA ジャイレースの活性比較

縦軸は生成される超らせん型 DNA の量、横軸は反応時間。グラフ中の WT (■) は野生型、95N (□)、91V (●)、95G (○)、89C (▲) は変異型 DNA ジャイレースの活性を示す。

対して耐性である事を証明した²⁰⁾。しかしながら、この結果からは、結核菌では頻繁に見出される 95N ならびに 95G の変異型 DNA ジャイレース A サブユニットを持ったキノロン耐性らい菌がなぜ患者から見出不来ないかという疑問に対する回答は得られなかった。そこで筆者らは DNA ジャイレース活性の変化に着目して、野生型ならびに各種変異型 DNA ジャイレースによってリラックス型プラスミド DNA が超らせん型 DNA に転換される様子を、時間を追って観察した。その結果、野生型ならびに各種変異型 DNA ジャイレースの活性に量的のみならず質的な変化も見出した (図 4)。GyrA 89C の変異型 DNA ジャイレースでは活性の量的低下が顕著であった。これに対して、GyrA 95N ならびに 95G の変異型 DNA ジャイレースは一定の割合までリラックス型プラスミド DNA を超らせん型 DNA に転換した後にそれ以上反応が進まないという質的な変化を示した。GyrA 95N ならびに 95G の変異型 DNA ジャイレースを持つらい菌が臨床検体から見出不来ない事は、この質的な変化がらい菌の増殖に何らかの負の影響を及ぼしている可能性を示唆している。一方、GyrA 89C の変異型 DNA ジャイレースでは顕著な活性の低下が見られるものの、臨床検体からはこの変異を持つらい菌が検出されていることから、本変異を持ったらい菌の増殖に正の影響を及ぼしている補完的変異または他のメカニズムが存在することが予想された。しかしながら、試験管内での培養が困難ならい菌を用いての検証は容易なものではない。筆者らは同一のアミノ酸置換を有するキノロン耐性結核菌株を保有して

いるため、この詳細な解析をした後、得られるデータを GyrA 89C 変異を持ったらい菌の解析にフィードバックしようと計画している。

おわりに

以上、薬剤耐性獲得機序に関する研究を例にとり述べてきた様に、ハンセン病研究は結核研究の該当する分野から多くの事を学んで来たものと言える。一方、本総説では取り上げなかったが、その逆の例も数多くある。ハンセン病研究が今後も数多くの事を結核研究から学び、得られた知見を結核研究にフィードバックする事で、双方の研究の更なる発展に繋がってゆくものと考えられる。

文献

- 1) Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 39: 693-702, 1971.
- 2) Kohsaka K, Mori T, Ito T. Lepromatoid lesion developed in nude mouse inoculated with *Mycobacterium leprae*--animal transmission of leprosy. Repura. 1976 45: 177-187, 1976.
- 3) Colston MJ, Hilson GR Growth of *Mycobacterium*

- leprae* and *M. marinum* in congenitally athymic (nude) mice. *Nature*. 262: 399-401, 1976.
- 4) Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, Pawinski R, Govender T, Lalloo U, Zeller K, Andrews J, Friedland G. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet*. 368: 1575-1580, 2006.
 - 5) Williams DL, Gillis TP. Drug-resistant leprosy: monitoring and current status. *Lepr Rev*. 83: 269-281, 2012.
 - 6) Matsuoka M. Drug resistance in leprosy. *Jpn J Infect Dis*. 63: 1-7, 2010.
 - 7) Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*. 358: 591-593, 1992.
 - 8) Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, de Lisle G, Jacobs WR Jr. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 263: 227-230, 1994.
 - 9) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 341: 647-650, 1993.
 - 10) Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreiswirth B, Cole ST, Jacobs WR Jr, Telenti A. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 38: 773-780, 1994.
 - 11) Xu C, Kreiswirth BN, Sreevatsan S, Musser JM, Drlica K. Fluoroquinolone resistance associated with specific gyrase mutations in clinical isolates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 174: 1127-1130, 1996.
 - 12) Suzuki Y, Nakajima C, Tamaru A, Kim H, Matsuba T, Saito H. Sensitivities of ciprofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates to fluoroquinolones: role of mutant DNA gyrase subunits in drug resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 39: 435-439, 2012.
 - 13) Honore N, Cole ST. Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 37: 414-418, 1993.
 - 14) Maeda S, Matsuoka M, Nakata N, Kai M, Maeda Y, Hashimoto K, Kimura H, Kobayashi K, Kashiwabara Y. Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. *Antimicrob Agents Chemother*. 45: 3635-3639, 2001.
 - 15) Cambau E, Bonnafous P, Perani E, Sougakoff W, Jarlier V. Molecular detection of rifampin and ofloxacin resistance for patients who experience relapse of multibacillary leprosy. *Clin Infect Dis*. 34: 39-45, 2002.
 - 16) Kai M, Matsuoka M, Nakata N, Maeda S, Gidoh M, Maeda Y, Hashimoto K, Kobayashi K, Kashiwabara Y. Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. *FEMS Microbiol Lett*. 177: 231-235, 1999.
 - 17) Williams DL, Spring L, Harris E, Roche P, Gillis TP. Dihydropteroate synthase of *Mycobacterium leprae* and dapsone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 44: 1530-1537, 2000.
 - 18) Müller B, Borrell S, Rose G, Gagneux S. The Heterogeneous Evolution of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Genet*. 29: 160-169, 2013.
 - 19) Maruri F, Sterling TR, Kaiga AW, Blackman A, van der Heijden YF, Mayer C, Cambau E, Aubry A. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. *J Antimicrob Chemother*. 67: 819-831, 2012.
 - 20) Yokoyama K, Kim H, Mukai T, Matsuoka M, Nakajima C, Suzuki Y. Amino acid substitutions at position 95 in GyrA can add fluoroquinolone resistance to *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 56: 697-702, 2012.

What Hansen's disease research learned from tuberculosis research: From molecular biological aspect

**Yasuhiko Suzuki*¹⁾, Tomoyuki Yamaguchi¹⁾, Hyun Kim²⁾,
Kazumasa Yokoyama³⁾, Chie Nakajima¹⁾**

¹⁾ Division of Bioresources, Hokkaido University Research Center for Zoonosis Control

²⁾ Laboratory of Tuberculosis Control, Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases

³⁾ Central Research Laboratory, Kissei Pharmaceutical Co., Ltd.

[Received/Accepted: 2 December, 2014]

Key words: *Mycobacterium leprae*, drug resistance, dapsone, rifampicin, quinolone

As for the *Mycobacterium leprae* which is a causative agent of Hansen's disease, many studies had been done since it was identified in 1873. However, those studies, at the same time, experienced many struggles because of the difficulty of culture of *M. leprae* on the artificial growth media. Hence, the study of Hansen's disease progressed by taking the knowledge from the study of tuberculosis caused by the bacteria belonging to the same genus, genus *Mycobacterium*. For instance, the knowledge of mutations in specific genes responsible for rifampicin- and quinolone-resistance in *M. tuberculosis* led the elucidation of drug-resistant acquisition mechanism of *M. leprae*. Similarly, it is necessary for the researcher of Hansen's disease to get important information from the latest topic of the tuberculosis study and utilize them to the study of the disease.

*Corresponding author:

Division of Bioresources, Hokkaido University Research Center for
Zoonosis Control

Kita 20, Nishi 10, Kita-ku, Sapporo, 001-0020 Japan

Tel: 011-706-9503, Fax: 011-706-7310

E-mail : suzuki@czc.hokudai.ac.jp